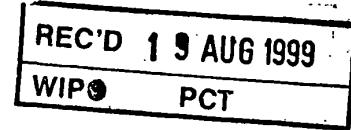


EP 9 970 489 2

QL **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

09/743494

EP 99 104892



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

EJKU

Die Hoechst Research & Technology Deutschland GmbH & Co KG in Frankfurt am
Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

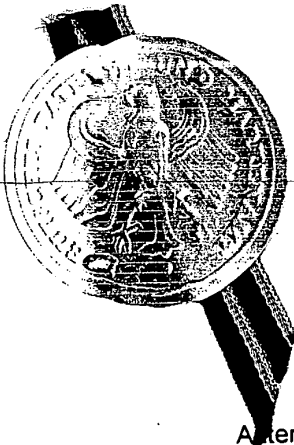
"Neue Gene der DEAD Box Protein-Familie, deren Expressions-
produkte und Verwendung"

am 22. Juli 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in:
Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 H, C 12 N und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.



München, den 27. Mai 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Keller

Anzeichen: 198 32 783.8

Beschreibung

5

Neue Gene der DEAD Box Protein-Familie, deren Expressionsprodukte und
Verwendung

10 Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung neuer Nukleinsäuren aus
Ciliaten kodierend für Expressionsprodukte, vorzugsweise RNA-Helikasen aus der
Familie der DEAD-Box-Proteine sowie deren Verwendung.

Die Modulation der RNA-Struktur hat eine essentielle Funktion in zellulären
Vorgängen wie z.B. beim prä-mRNA-Spleißen, beim RNA-Transport oder bei der
15 Proteintranslation, da die zelluläre RNA in der Zelle in unterschiedlichen Sekundär-
und Tertiärstrukturen vorliegt und daneben eine Vielzahl von RNA-bindender
Proteine für eine weitere Strukturierung der RNA sorgt. An diesen
Modulationsvorgängen sind u.a. Proteine aus der Familie der sogenannten DEAD-
Proteinfamilie beteiligt. Die Mitglieder dieser Proteinsuperfamilie, die als
20 Charakteristikum eine Reihe homologer Proteinsequenzen, sogenannte
„Proteinboxen“ enthalten, sind nach dem hochkonservierten Tetrapeptid Asp-Glu-
Ala-Asp, im Einbuchstabencode DEAD, als Motiv benannt. Zu dieser
Proteinsuperfamilie gehören insbesondere RNA-Helicasen.

25 Die charakteristischen Proteinsequenzen der DEAD-Proteine sind in der Evolution
hochkonserviert (Vgl. Figur 1).

Die DEAD-Superfamilie gliedert sich in verschiedene Unterfamilien, die nach ihrem
Sequenzmotiv DEAD-, DEAH- oder DExH-Unterfamilie genannt werden. Alle
30 Familienmitglieder besitzen eine ATP-Binde- und RNA-Bindefunktion sowie eine
ATP-Hydrolyse- und zumeist eine RNA-Helicasefunktion (Fig. 2).

Die verschiedenen Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie zeichnen sich aus durch eine konservierte Region, die ca. 300 Aminosäuren umfaßt und von nicht-konservierten Aminosäuresequenzen variierender Länge flankiert wird (Schmid S.R., Lindner P., Mol Cell Biol 1991 11: 3463-3471).

5

Innerhalb der konservierten Region liegen die sogenannten Homologieboxen (synonym konservierte Motive), wovon eine die „DEAD-Box“ ist. Die

Homologieboxen verleihen den Mitgliedern der DEAD-Box-Familie nicht nur strukturelle sondern auch funktionelle Ähnlichkeit. Unter Berücksichtigung der

- 10 Homologieboxen (siehe Figur 2) sind DEAD-Box Proteine putative ATP-abhängige RNA-Helikasen, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und mit der Veränderung der Sekundärstruktur von RNA-Molekülen in Zusammenhang stehen (Fuller-Pace F.V. Trends Cell Biol. 1994 4:271-274, Pause A., Sonenberg N., Curr Opin Struct Biol 1993 3:953-959). Helikase-abhängige Prozesse sind ebenfalls
- 15 beschrieben worden für: Initiation der Translation, nukleares und mitochondriales RNA-Spleißing, mRNA-Transport, Ribosom- und Spleißosom-Assembly, mRNA-Stabilisierung und mRNA Abbau (Iost I., Dreyfus M., Nature 1994 372:193-196).

Die Funktionen der RNA-Helikasen korrespondierend mit den DEAD-

- 20 Homologieboxen in zellulären Prozessen, vorzugsweise im Rahmen der Proteinbiosynthese, erlauben diese Enzyme gezielt einzusetzen im Hinblick auf pharmazeutische, landwirtschaftliche oder biotechnische und analytische Anwendungen.

- 25 Wichtige pharmazeutische Anwendungen sind die Entwicklung von Substanzen, die spezifisch bakterielle, parasitäre, virale oder aus pathogenen Pilzen stammende Helikasen hemmen, jedoch keine Hemmwirkung auf menschliche Helikasen haben.

Da Helikasen zumeist essentielle Enzyme sind, kann man durch spezifische

- Hemmung dieser Enzyme eine Abtötung des Pathogens (Bakterium, Pilz, Parasit/Protozoe, Virus) erreichen. Nach Missel et al. führt bei bestimmten
- 30 Protozoen (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia*) das Ausschalten des Gens für ein DEAD-Box-Protein zu verringertem Wachstum (Missel A., Souza A.E., Norkau G,

Goringer H.U., Mol Cell Biol 1997 17:4895-903). Im Malariaerreger *Plasmodium falsiparum* kontrollieren Helikasen die Protein-Translation, Mitose sowie DNA Reparatur (Thelu J, Burnod J, Bracchi V, Ambroise-Thomas P, DNA Cell Biol 1994 13: 1109-1115). Helikasen sind essentiell für die Initiation der Translation, im
 5 Spleißosom, im Zellzyklus und Ribosomen Zusammenbau in Hefe. So ist z.B. das DEAD-Box-Protein ROK1 essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefe, für das prä-rRNA-Processing, und für mitotisches Wachstum. Ausschalten von ROK1 blockiert 18S rRNA Synthese (Venema J., Bousquet-Antonelli C., Gelugne J.P., Caizegues-Ferrer M., Tollervey, Mol Cell Biol 1997 17: 3398-3407).

10

Ca. 80% aller „positive-stranded“ RNA Viren deren Genome sequenziert sind, kodieren für mindestens eine putative Helikase. Beispiele sind NS3 des Hepatitis C Virus, Helikasen des menschlichen Coronavirus und des Adeno-associated Virus, Vaccinia Virus Helikase (Kadare G., Haenni A.L., J Virol 1997: 2583-2590). Mögliche
 15 Rollen für virale Helikasen sind (i) Proof-reading bei der Replikation (ii) Initiation der Transkription durch Aufwinden der RNA und Verhinderung von Loop-Bildung hinter der RNA Polymerase (iii) Initiation der Translation. Die Helikase des Vaccinia Virus ist essentiell für den Lebenszyklus des Virus und Nukleinsäure-spezifisch.

20 Es gibt Hinweise darauf, daß zumindest einige Helikasen sehr spezifisch aktivierbar sind. So brauchen z.B. DpbA aus E. coli (Fuller-Pace F.V., Nicol S.M., Reid A.D., Lane D.P., EMBO J 1993 12:3619-3626) und Slit22 aus Hefe (Xu D., Nouraini S., Field D., Tang S.J., Friesen J.D., Nature 1996 381: 709-716) spezifische RNA-Liganden zur Aktivierung.

25

Desweiteren werden DEAD-Box-Proteine in Assoziation mit Krankheiten beschrieben. Die Amplifizierung eines spezifischen Gens in Krebszellen (N-myc) steht in Verbindung mit der Tatsache, daß ein DEAD-Box-Protein mit N-myc co-amplifiziert wird, welches auf eine Rolle dieses Proteins in der Entartung von
 30 Krebszellen hinweist (George R.E., Kenyon R.M., McGuckin A.G., Malcolm A.J., Pearson A.D., Lunec J., Oncogene 1996 12: 1583-7). Mutationen einer RNA-Helikase stehen im Zusammenhang mit dem Werner-Syndrom - frühzeitige Alterung

- (Yu C., Oshima J., Wijsman E.M., Nakura J. et al., Am J Hum Genet 1997 60: 330-341) und mit Xeroderma pigmentosum (Kobayashi T., Kuraoka I., Sailo M., Nakatsu Y., Tanaka A. et al., Hum Mut 1997 9: 322-331). Weiterhin ist ein möglicher Zusammenhang zwischen DEAD-Box-Proteinen und Bindegewebskrankheiten postuliert worden (Valdez B.C., Henning D., Perlaky L., Busch R.K., Busch H., Biochem Biophys Res Commun 1997 234: 335-340). Bekannt ist außerdem ein Zusammenhang zwischen defekter DNA Reparatur und einer Mutation in der Helikasedomäne des XNP/ATR-X Gens (Villard L., Lossi AM, Cardoso C, Proud V, Chiaroni P, Colleaux L, Schwartz C, Fontes M Genomics 1997 43: 149-155).

10

Zusätzlich zu Helikasen aus Menschen oder aus diversen Krankheitserregern sind auch Helikasen aus Pflanzen von größtem Interesse. Einige DEAD-Box-Proteine aus Pflanzen sind mittlerweile bekannt (Lorkovic Z.J., Herrmann R.G., Oelmüller R., Mol Cell Biol 1997 17: 2257-2265 und Aubourg et al., Gene 1997 199(1-2): 241-253). Strukturell sind diese Proteine den DEAD-Box-Proteinen aus nicht pflanzlichen Organismen zwar ähnlich, bilden jedoch eine Untergruppe (Fig.3). Fig.3 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft verschiedener eIF4A, eines der am besten charakterisierten Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie, aus verschiedenen Organismen. Die pflanzlichen Proteine sind untereinander wesentlich näher verwandt als mit eIF4A aus tierischen Eukaryonten. Eine für die landwirtschaftliche Produktion interessante Anwendung ist die Stimulation der Aktivität pflanzenspezifischer RNA-Helikasen zur Steigerung der Proteinexpression wirtschaftlich relevanter Proteine. Dabei kann man entweder Pflanzen-eigene Helikasen stimulieren (z.B. durch Überexpression) oder Pflanzen-ähnliche Helikasen heterolog in Nutzpflanzen exprimieren.

20

25

Daher ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Nukleinsäuren bereitzustellen, die vorzugsweise für RNA-Helikasen kodieren.

30

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Nukleinsäuren kodierend für RNA-Helikasen bereitgestellt werden, welche vorzugsweise aus Ciliaten, besonders bevorzugt Tetrahymena thermophila, gewonnen werden. Die erfindungsgemäßen

Nukleinsäuren kodieren für Expressionsprodukte, welche aus der Familie der DEAD-Box-Proteine stammen und somit auch für RNA-Helikasen.

Expressionsprodukte, vorzugsweise Proteine aus der DEAD-Proteinsuperfamilie im Sinne dieser Erfindung sind solche, die konservierte Motive besitzen, worunter ein konserviertes Motiv die Aminosäurereihenfolge DEAD enthält. Vorzugsweise enthalten die Proteine eine RNA-Helicase- und ATP-ase-Aktivität.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nukleinsäuren kodierend für RNA Helikasen, mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 4 oder Fig. 6 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend „erfindungsgemäße Nukleinsäuren“ genannt).

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit der Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 4 (im folgendem „Hc1“) kodiert für eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 5.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit der Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 6 (im folgendem „Hc2“) kodiert für eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in E. coli führte zu einem Expressionsprodukt, welches ähnliche enzymatische Aktivitäten wie die einer RNAHelikase zeigt. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine RNA-Helikase kodiert, insbesondere aufgrund des Vorliegens der charakteristischen Homologieboxen, wie in Fig. 5 und Fig. 7, die in Fig. 1 wiedergegeben sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz kodierend für RNA-Helikasen.

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit RNA Helikasen mit den beschriebenen Homologieboxen verwandt ist.

- 5 Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff „Varianten“ gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.
- 10 Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim
- 15 PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

- Insbesondere können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren verwendet werden,
- 20 um komplementäre bzw. Antisense Nukleinsäuren zu konstruieren, die mit Hc1 oder Hc2 selbst oder mit verwandten Nukleinsäuren hybridisieren. Das Einbringen der komplementären bzw. Antisense Nukleinsäure in die Zielzelle verhindert die Expression verwandter RNA-Helikasen, oder verwandter Expressionsprodukte.

- 25 Anti-Sense Nukleinsäuren, welche aus den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältlich sind, können daher zur spezifischen Regulation der Genexpression verwendet werden. Dabei kann entweder die Zielzelle mit dem Anti-Gen nach bekannten Methoden transfiziert werden, welches dann in der Zelle transkribiert wird oder in vitro synthetisierte Antisense-RNA oder DNA wird über Mikroinjektion in die
- 30 Zielzelle eingebracht. Es ist bekannt daß Genexpression inhibiert werden kann durch Anti-Sense-RNA die komplementär zum kodierenden Bereich der Ziel-mRNA

ist. Der aus mRNA und Anti-Sense-RNA gebildete Duplexstrang ist dem schnellen Abbau durch RNAsen zugänglich.

Die Hemmung von Transkription und Translation durch die dargelegte Antisense-
5 Technik wurde auch erfolgreich in Pflanzenzellen durchgeführt (van der Krol A.R. et al. Nature 1988 333: 866).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine
10 Poly(A)-Sequenz. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression der Expressionsprodukte vorzugsweise von RNA-Helikasen.

15 In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische
20 Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 oder pGEX-4T-1 GST (Pharmacia Biotech), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni²⁺-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in
25 Saccharomyces cerevisiae eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

30 Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in E. coli (s.

z.B. EP-B1-0154133) in *E. coli*, den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) *Nature*, 214, 228).

Die so gewonnenen rekombinanten Proteinen werden mit geeigneten Methoden aufgereinigt (z.B. Affinitätschromatographie, HPLC, FPLC) und in Lösung gebracht (Guanidin, Harnstoff). Die Charakterisierung der Proteinen und die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt mit Hilfe etablierter Tests (RNA-Bindung, ATPase-Aktivität, Helikase-Aktivität).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z.B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) *Virol.* 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in „Eukaryotic Viral Vectors“ (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) *Virol.* 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) *EMBO J.* 5, 2377 oder WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) *J. Virol.* 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5, 793 beschrieben.

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 84,

7413; Behr, J.P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der in den Figuren 4 und 6 offenbarten Sequenz oder anhand der in Figuren 5 und 7 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4).

Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren selbst und Varianten zu erhalten, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß Figur 4 und 6 abgeleitet werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur spezifischen Beeinflussung der Proteinbiosynthese.

Experimente zeigen, daß eine gesteigerte Helikase-Aktivität zu einer verstärkten Aufwindung der Ziel-RNA führt. Hierdurch wird die Ziel-RNA zugänglich für Bindungspartner, wie Proteine, insbesondere Enzyme oder Enzymkomplexe für die ribosomale Translation oder für den Abbau durch das Degradasom. Daraus folgt, je nach Ziel-RNA 1) eine gesteigerte Translation und daher eine gesteigerte Proteinbiosynthese 2) ein schnellerer Abbau durch das Degradasom und somit eine

verringerte Proteinbiosynthese. Eine Hemmung der Helikase-Aktivität kann den Abbau durch das Degradasom hemmen und zu einer verminderten Proteinbiosynthese führen. Grundlage hierfür ist die Erkenntnis, daß durch die selektive Hemmung oder Aktivierung von Helikasen wichtige biosynthetische Prozesse gezielt reguliert werden können.

Die Nukleinsäuren werden hierzu rekombinant in geeigneten Zielorganismen wie beschrieben exprimiert.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc1, sind ein hervorragendes Modell für diverse eukaryontische RNA-Helikasen, vorzugsweise aus Menschen und Parasiten (Figur 3A). Die genetische Verwandtschaft von Hc1 zu relevanten eukaryontischen Helikasen ist eng genug, um von Versuchen mit Hc1 Rückschlüsse auf Struktur und Funktion anderer eukaryontischer Helikasen (z.B. menschlichen) zu ziehen. Figur 3A zeigt die genetische Verwandtschaft einiger Helikasen aus verschiedenen Organismen im Vergleich zu Hc1. Besonders überraschend ist die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Hc1 und Säugetierhelikasen aus Mensch und Maus und der große strukturelle Unterschied zwischen Hc1 und bekannten viralen Helikasen.

20

Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen gemäß Fig. 3B erweist sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, als ein hervorragendes Modell für diverse eukaryontische RNA-Helikasen, vorzugsweise aus Pflanzen. Fig. 3B zeigt die genetische Verwandtschaft einiger RNA Helikasen aus verschiedenen Organismen im Vergleich zu Hc2. Besonders überraschend ist die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Hc2 und RNA Helikasen aus Pflanzen. Die rekombinante Expression von Hc2 ermöglicht die Nutzung dieses neuen Enzyms als Modell zur Erforschung insbesondere pflanzlicher Helikasen, deren Struktur und Funktion, sowie zur Entwicklung geeigneter Inhibitoren bzw. Aktivatoren diese wichtigen Enzyme. So wurde für PRH75 aus Spinat postuliert, daß dieses Enzym ein sehr spezifischen RNA-Liganden braucht, um aktiv zu sein (Lorkovic Z.J., Herrmann R.G., Oelmüller R., Mol Cell Biol 17(4): 2257-2265 (1997)).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die gezielte heterologe Expression - mittels Überexpression nach bekannten Methoden - der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, in geeigneten Nutzpflanzen zur potentiellen Steigerung der Biosynthese relevanter Proteine.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, können über rekombinante DNA-Technologien in Pflanzen eingebracht werden. Als Methode kann das Einschleusen des Fremdgens mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* benutzt werden. Hierbei wird das Fremdgen in das Genom der Bakteriums in bekannter Weise eingebracht. Bei Infektion der Zielpflanze werden die Gene des Bakteriums inklusive des Fremdgens stabil in das Genom der Pflanze integriert (Chilton M.D. et al., Cell 1977 11:263, Barton K.A. et al., Cell 1983 32: 1033). Diese Methode wird vorzugsweise für die Transformation von Dikotyledonen eingesetzt. Zur Transformation von Monokotyledonen können die bekannten Methoden wie Kalziumphosphat- Präzipitation, PEG Behandlung, Elektroporation, oder eine Kombination dieser Methoden eingesetzt werden (Potrykus I. et al., Mol Gen Genet 1985 199:183; Lorz H. et al., Mol Gen Genet 1985 199: 178; Fromm M et al. Nature 1986 319:791; Uchimiya H. et al., Mol Gen Genet 1986 204: 204). Möglich ist auch ein Einbringen der Fremd-DNA in die Pflanzenzelle mit Hilfe der sogenannten Gene-Gun (Klein T.M. et al. Nature 1987 327: 70).

20

Eine weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Nukleinsäuren als Selektionsmarker in der Molekularbiologie. Konventionell verwendete Selektionsmarker sind Antibiotika. Molekularbiologisch veränderte Organismen tragen ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum verleiht. Die Organismen werden in Antibiotika-haltigem Medium angezogen, so daß sich nur die Träger des Resistenzgens entwickeln können. Analog kann man Helikasegene als „Resistenzgene“ verwenden. Es wurde gezeigt (Müllner et al, Patentanmeldung DPA 19545126.0), daß die Überexpression eines Helikasegens bei Mauszellen diesen Zellen Toleranz gegenüber einer sonst toxischen Substanz, Leflunomid, verleiht. Es ist somit möglich, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Selektionsmarker in der Molekularbiologie einzusetzen, wobei mit einem geeigneten Vektor, wie

30

beschrieben, die erfindungsgemäße Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen sind und mit einer geeigneten Substanz, wie Leflunomid), gegen die die Zellen durch Überexpression der Helikase tolerant sind, zu selektionieren.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Expressionsprodukte, vorzugsweise Polypeptide und Polypeptidfragmente (die Hc1 und Hc2 kodieren) selbst, mit Aminosäuresequenzen gemäß Figur 5 und 7 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit
- 10 mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 257 Aminosäuren Hc1 und 255 Aminosäuren Hc2 (nachfolgend „erfindungsgemäße Polypeptide“ genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US
- 15 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

- Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ im Sinne der vorliegenden Erfindung
- 20 versteht man Polypeptide, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Peptiden verwandt sind, d.h. eine RNA-Helikaseaktivität aufweisen. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von anderen Zellen bzw. Gewebe abstammen.

- 25 Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu den Polypeptiden mit den Aminosäuresequenzen gemäß Figur 5 und 7 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60,
- 30 vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Hierzu zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten; wobei die

Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer RNA-Helikase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His₆-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. „NTA“ steht für den Chelator „nitrilotriacetic acid“ (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Durch Vergleich mit bekannten Helikasen wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide ein Mitglied der sogenannten DEAD-Superproteinfamilie ist. Figur 1 zeigt die konservierten Motive, die für diese Klasse von RNA-Helikasen charakteristisch sind. All diese Motive sind innerhalb der Familie hoch konserviert und werden auch in den erfindungsgemäßen Polypeptiden gefunden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid wird beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem für den Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen

sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

- 5 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

10

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers,

- beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den
15 genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über

- 20 Säulenchromatographie reinigen.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten,
30 insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten

und/oder Diabetis und /oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen und/oder Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, beispielsweise eine sogenannten Antisense-Nukleinsäure, oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält.

Als geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die erfindungsgemäßen Polypeptide oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und /oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen und/oder zur Analyse von Erbkrankheiten, insbesonderev Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt werden.

Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern Blots hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen

5 Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z.B. in EP0063879 beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit α -P32-dATP oder nicht-radioaktiv mit

10 Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus

15 jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon,

20 die vorzugsweise an eine Festphase, z.B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z.B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörpern reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-

25 IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit

über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

30 Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid

vorhanden ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

5

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete

10 Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

15

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren ist z.B. das sogenannte „Two-Hybrid System“ (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus E. coli, enthält und/oder ein Fusionsprotein exprimieren, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4,

20 Herpesvirus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, beispielsweise das LacZ-Gen aus E. coli, „Green Fluorescence Protein“ oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Sequenzen, wie z.B. den lexA-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte „Upstream Activation Sequence“ (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte

25 Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

30

Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die lexA-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen

Polypeptid und der LexA-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem
5 unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2- ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den LexA-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem
10 erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die LexA-DNA-Bindedomäne an den LexA-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2- Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.

15 Bei Verwendung des LacZ- bzw. „Green Fluorescence Protein“-Reportergens anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im
20 Spectrophotometer z.B. bei 585 nM im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden interagieren. Anschließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter
25 charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des „Two-Hybrid-Systems“ ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z.B.
30 chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum

Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

Beschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt schematisch die konservierten Bereiche (Homologieboxen) der Proteine aus der DEAD-Proteinsuperfamilie. Die Zahlen zwischen den Bereichen geben die Abstände in Aminosäuren zwischen den Homoboxen an.

Figur 2 beschreibt schematisch die konservierten Bereiche und deren bekannten Funktionen der exprimierten Proteine nach Fuller Pace, F.V. (1994), supra.

Figur 3A und 3B beschreiben die phylogenetischen Bäume von Hc1 und Hc2 und stellt die evolutionäre Bezüge her. Die Erstellung dieser Figuren erfolgte mit dem Programm: Lasergene (Modul MegAlign 3.1.7) der Firma: DNASTAR Inc.; mit Hilfe des Clustal- Algorithmus (Higgins D.G, Sharp P.M., CABIOS (1989), Vol. 5, no.2, 151-153).

Figur 4 gibt die Nukleinsäuresequenz von Hc1 wieder.

Figur 5 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz zu Figur 4.

Figur 6 gibt die Nukleinsäuresequenz von Hc2 wieder

Figur 7 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz zu Figur 5.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne dieselbe auf in den Beispielen beschriebenen Produkte und Ausführungsformen einzuschränken.

5 Beispiele

Die praktische Arbeiten, die zur der vorliegenden Erfindung geführt haben, basieren in der Hauptsache auf etablierte, bekannte Methoden der Mikrobiologie, der Molekularbiologie und rekombinanter DNA Technologie.

10

Beispiel 1: Kultur von Tetrahymena thermophila

Tetrahymena thermophila, Stamm B1868IV, wurde in PPYS-Medium (10 g/l Proteose Pepton Nr.3 DIFCO, 1 g/l Hefeextrakt DIFCO, 10 mg Natriumcitrat, 24,3 mg FeCl_3) im 500 ml Kolben angeimpft (100.000 Zellen/ml PPYS) und 2-3 Tage bei 15 25°C und 100-150 rpm inkubiert, bis zu einer Zelldichte von ca. 1 Mio/ml.

Beispiel 2: Isolierung der mRNA

Aus 200 ml Schüttelkultur von Tetrahymena thermophila, Stamm B1868IV wurde nach Chomczynski & Sacchi, 1987 Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurden ca. 2 Mio 20 Zellen in Gegenwart von Guanidin Thiocyanat / Sarkosyl / beta-Mercaptoethanol lysiert. Nach Zugabe von Natriumacetat und Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol (25:24:1) wird gut gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und danach 20 min bei 10.000xg, 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und mindestens 30 min bei -20°C stehen gelassen. Das RNA Pellet wird 25 durch Zentrifugation gewonnen (10 min, 10.000xg, 4°C). Das Pellet wird noch zweimal gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen. Nach einer 10 - 15minütigen Inkubation bei 55-60°C kann die RNA bei -80°C aufgehoben werden.

Aus der Gesamt-RNA wird über Oligo(dT)-Sephadex (Clontech mRNA Separator Kit #K1040-2) mRNA aufgereinigt

Beispiel 3: Herstellung von cDNA

Die mRNA wurde nach CLONTECH in cDNA überschrieben (CapFinder™ PCR cDNA Library Construction Kit #K1051-1).

5 Beispiel 4: Amplifizierung spezifische Gen-Fragmente

Spezifische Gen-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Ein Standard-PCR-Ansatz enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine, 75 µM dNTP, 0.3 ng von jedem Primer, 0,5 µl cDNA, 0,5 U Taq Polymerase. Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1

10 wurden die Primer

(2) 5'-GTTCTACCAATTCTGTG-3' und

(3) 5'-ACnGGTTCnGGTAAGAC-3' verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes Hc2 wurden die Primer

(4) 5'-ATAGAATTCCCAACnAGAGAAAnTnGCT-3' und

15 (8) 5'-ATAGGATCCGTTCTACCAATTCTGTG-3' verwendet, wobei n ein beliebiges Nukleotid ist. Das PCR-Programm war 5 min 95°C, 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Beispiel 5: Klonierung und Sequenzierung der Fragmente

20 Nach PCR wird das PCR-Produkt auf 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die spezifischen Fragmente werden ausgeschnitten und mit QIAGEN Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die gereinigten Fragmente werden direkt zur Klonierung eingesetzt (Invitrogen Original TA Cloning Kit #K2000-01). Positive Klone werden in Schüttelkultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit QIAGEN Maxi-Prep-Kit

25 aufgereinigt. Sequenziert wird mit Automated Sequenzer AbiPrism Model 377.

Rekombinante Expression

Die Genfragmente Hc1 bzw. Hc2 werden in einen geeigneten Vektor kloniert, vorzugsweise pGEX-4T-1 GST-Fusionsvektor (Pharmacia Biotech). Dazu werden

30 Hc1 und Hc2 mit geeigneten Primern über PCR aus Tetrahymena thermophila cDNA hergestellt. Ein Standard-PCR-Ansatz enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine, 75 µM dNTP, 0.3 ng von jedem Primer, 0,5 µl

cDNA, 0,5 U Taq Polymerase. Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1 wurden die Primer

(2A) 5' ATAAGAATGCGGCCGCTGTTCTACCGATTCTGTGAATATA 3'

(3A) 5' CGCGGATCCTC ACT GGT TCG GGT AAG ACT GCT ACT TTC TCT 3'

5 verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes Hc2 wurden die Primer

(7A) 5' TATAGAATCCCCACTAGAGAACTCGCTATGCAAATCGAA 3'

(8A) 5' ATAAGAATGCGGCCGCGTTCTACCGATTCTGTGGACATAG 3' verwendet.

Primer (2A) enthält eine NotI-Schnittstelle, (3A) eine BamHI- Schnittstelle, (7A) eine EcoRI- und (8A) ein NotI-Schnittstelle. Das PCR-Programm war 5 min 95°C,

10 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Die zu klonierenden Fragmente werden über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt

(QIAgen Gelextraktion Kit) und die zu klonierenden Enden durch Verdau mit NotI

und BamHI (Hc1) bzw. EcoRI und NotI (Hc2) vorbereitet. Der Vektor pGEX-4T-1

wird ebenfalls durch Verdau mit NotI und BamHI (Hc1) bzw. EcoRI und NotI (Hc2)

15 vorbereitet. Vektor und Insert werden über Nacht bei 16°C ligiert, die

Ligationsansätze werden zur Transformation von kompetenten TOP10F⁺ (Invitrogen)

E.coli Zellen eingesetzt. Positive Klone werden gepickt und zur Proteinexpression

verwendet. Das Konstrukt pGEX-Hc1 bzw. pGEX-Hc2 erlaubt die Translation eines

Fusionsproteins bestehend aus 257 Aminosäuren (28,3 kDa) von Hc1 bzw. 255

20 Aminosäuren (28,1 kDa) von Hc2 und Glutathion-S-Transferase (24 kDa) . Das

Fusionsprotein enthält alle Homologieboxen (DEAD, SAT,...) welche die Mitglieder

der Proteinfamilie auszeichnen. Zur rekombinanten Proteinexpression wird eine

Übernacht-Kultur mit IPTG induziert und das Fusionsprotein aus dem Überstand im

Batchverfahren mit Glutathion Sepharose 4B oder über eine Glutathion Sepharose

25 4B Säule aufgereinigt. Die Glutathion-S-Transferase wird mit Thrombin gespalten.

Dazu werden z.B 100 µg GST-Fusionprotein mit einer Einheit Thrombin Proteinase

in 1x PBS bei 22°C für 16 Std. inkubiert. Das Genprodukt von Hc1 bzw. Hc2 wird

über Gelfiltration abgetrennt, z.B. mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule

(Pharmacia Biotech). Als Standard kann der Gel Filtration Chromatography

30 Standard von Biorad (Ref. 151-1901) verwendet werden.

Beispiel 6: ATPase Aktivität

Die Aktivität wird bestimmt wie in der Literatur beschrieben, z.B. nach Jaramillo et al., Mol Cell Biol 1991 11:5992; Rozen et al., Mol Cell Biol 1990 10: 1134, Ladomery M. et al. Nucl. Acid Res. 1997, 25:965-973 oder Dong F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 14456-14461 oder Patent PCT/US97/01614. Nachfolgend wird ein konkretes Beispiel beschrieben. Die Reaktionsmischung zur Messung der ATPase Aktivität enthält 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Hepes/KOH, pH 7, 1 mM Dithiothreitol, 1mM PMSF, 10 µM ATP und 0,2 µl 32P-ATP in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Reaktionsmischung wird auf 37 °C erwärmt und Hc1 bzw. Hc2 wird dazugegeben. Nach 30 min bei 37 °C wird die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 7% Aktivkohle in 50 mM HCl und 5 mM H₃PO₄ gestoppt. Die Proben werden gemischt, und 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die freigesetzte Radioaktivität wird mit einem Scintillationszähler im Überstand gemessen.

Beispiel 7 : Helikaseaktivität

Die Helikase-Aktivität von Hc1 bzw. Hc2 kann gemessen werden, indem man die Dissoziation doppelsträngiger RNA verfolgt. Das Substrat kann ein beliebiges RNA-Oligomer sein, das an einem Strang markiert ist, z.B. mit 32P. Die Reaktionsmischung enthält in einem 10 µl Ansatz 32P-markiertes Helikasesubstrat, Hc1 bzw. Hc2 in verschiedenen Konzentrationen, 2 mM ATP, 5 mM Dithiothreitol und 50 µg bovines Serum Albumin in 20 mM Tris-HCl. Die Reaktion wird bei 37°C über 30 min durchgeführt und durch Erhitzen gestoppt.

Die Reaktionsmischung wird auf ein 16 cm X 18 cm 12% nicht-denaturierendes Polyacryamidgel aufgetragen und bei konstanter Stromstärke von 25 mA aufgetrennt. Das Gel wird unter Vakuum getrocknet und exponiert (z.B. Kodak RPXRP-5 Film, -70°C).

Beispiel 8 : Antisense

Die RNA-Gegenstränge der DNA-Fragmente Hc1, Hc2 oder von DNA-Sequenzen die homolog zu Hc1 oder Hc2 sind oder Teilsequenzen von Hc1, Hc2 oder Homologen können als Antisense-Stränge eingesetzt werden. Üblicherweise wird ein Plasmid konstruiert, welches die gewünschte Antisense-Sequenz trägt, sowie

Selektionsmarker, z.B. Neomycin, einen Promotor der die Expression der Antisense-RNA kontrolliert und RNA-stabilisierende Sequenzen. Die transkribierten Sequenzen werden in der Zelle transkribiert und das Transkript hybridisiert mit der Ziel-DNA. Andererseits können in vitro synthetisierte Sequenzen auch durch Mikroinjektion in die Zelle gebracht werden.

Denkbar ist auch der Einsatz von Oligonukleotiden. Diese können entweder synthetisch hergestellt oder durch Restriktionsverdau von Hc1, Hc2 oder Homologen generiert werden. Die Oligonukleotide müssen hochrein sein. Dies erreicht man durch 2 - 5 maliges Lyophilisieren. Reine Oligonukleotide werden z.B. in HEPES gepufferter Saline, pH 7,4 aufgenommen.

Beispiel 9: Gensonde zum Auffinden neuer Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie

Die Fragmente Hc1 und Hc2 werden benutzt, um aus geeigneten Organismen neue DEAD-Box-Proteine zu isolieren. Dazu werden die spezifischen Gen-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig mit Digoxigenin markiert, nach Boehringer Mannheim PCR DIG Probe Synthesis Kit #1636 090. Als Template dient Plasmid-DNA der klonierten Fragmente Hc1 bzw. Hc2. Ein PCR-Ansatz enthält Expand™ High Fidelity Puffer (Boehringer Mannheim #1636 090), 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 130 µM dTTP, 70 µM DIG-11-dUTP, 0.3 ng von jedem Primer, 100 pg Plasmid-DNA, 2,6 U Taq Polymerase.

Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1 wurden die Primer
(2) 5'-GTTCTACnATTCTGTG-3' und
(3) 5'-ACnGGTTCnGGTAAGAC-3' verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes

Hc2 wurden die Primer

(4) 5'-ATAGAATTCCnACnAGAGAA nTnGCT-3' und

(8) 5'-ATAGGATCCGTTCTACnATTCTGTG-3' verwendet.

Das PCR-Programm war 5 min 95°C, 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Das PCR-Reaktionsgemisch, das die markierten Fragmente enthält, wird direkt für Hybridisierungsversuche eingesetzt. Dazu wird das PCR-Produkt 10 min bei 95°C denaturiert und mit der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim Ref. 1603558) versetzt (Konz. 2 µl/ml). Mit dieser Hybridisierungslösung werden
 5 cDNA-Banken geeigneter Organismen bei niedriger Stringenz (Hybridisierungstemperatur 30 - 50 °C) gescreent.

Beispiel 10: Antikörper

Rekombinant exprimiertes Protein wird nach einer geeigneten Methode aufgereinigt
 10 und dazu benutzt, um in einem geeigneten Organismus, z.B. Ratte oder Kaninchen, polyklonale Antikörper zu generieren. Dazu wird das Fusionsprotein z.B. zunächst über Glutathion Sepharose und dann über SDS-PAGE aufgereinigt. Die Bande, die das Fusionsprotein enthält wird aus dem Gel ausgeschnitten, zermahlen und z.B. einem Kaninchen oder einer Ratte eingespritzt. Das erhaltene Antiserum wird über
 15 eine IgG Säule gegeben, die Antikörper bei niedrigem pH in 1 M Tris-HCl pH 8 eluiert. Die Antikörper werden gegen 25 mM HEPES pH 7.9, 12 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 17% Glycerin, 100 mM KCl dialysiert.

Beispiel 11: Einsatz der Antikörper zum Isolieren neuer DEAD-Box-Proteine

Die wie im vorstehenden Abschnitt beschrieben erhaltenen Antikörper werden dazu
 20 verwendet aus geeigneten Organismen neue DEAD-Box Proteine zu isolieren. Dazu werden die Antikörper kovalent an eine geeignete Matrix gekoppelt, z.B. Sephadex G50 (Pharmacia). Mit dem Sephadex werden z.B. Biorad Säulen 1.5 x 10 cm oder 2.5 x 10 cm gepackt und mit 20 ml Puffer A (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.005 M
 25 EDTA, 0.1% NP40, pH 8.0) equilibriert. Danach werden 3.0 g Protein A-Sepharose Beads (Pharmacia CL-4B) auf die Säule gegeben. Über Nacht bei 4°C stehen lassen. Die Antikörperlösung wird auf die Säule gegeben und bei 4°C mit einer Flußrate von ~100 ml/hr durchtropfen gelassen. Danach wird die Säule mehrmals gewaschen: mit 250 ml Puffer A (plus 0.5%NP40), danach mit 125 ml 0.1 M Borat
 30 Puffer, pH 9.0, danach mit 125 ml Borate Puffer pH8.0 , danach mit 125 ml 0.2 M Triethanolamine, pH 8.2. Über Cross-linking wird die Fc-Region des Antikörpers an die Protein A-Sepharose gekoppelt. Danach wird die Säule nochmals gewaschen,

und zwar einmal mit Puffer B (0.15 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerol, 10 % NP-40), einmal mit Puffer C (0.05 M Tris-HCl, 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10% Glycerol), und einmal mit Puffer D (0.01 M Pipes, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10% Glycerol). Der nicht gecrosslinkte Antikörper wird mit
 5 Citratpuffer eluiert. Gelagert wird die Säule mit Borate Puffer, pH 8.0 mit 0.02% Na N3.

Um neue DEAD-Box Proteine zu isolieren wird Zelllysate geeigneter Organismen auf die Antikörpersäule gegeben. Die Säule wird mehrmals gewaschen und die
 10 gebundenen Proteine mit einem geeigneten Puffer, z.B. Glycin, pH 3, in Tris-HCl, pH 8, eluiert.

Beispiel 12: Überexpression in Nutzpflanzen

Die Genfragmente Hc1 und Hc2 können heterolog in Nutzpflanzen exprimiert
 15 werden. Der Gentransfer kann beispielsweise über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt werden. Ein typischer *A. tumefaciens* Vektor (Ti-Plasmid) enthält einen Replikationsursprung (Ori-Agro), der die Replikation in *Agrobacterium* erlaubt, einen Replikationsursprung Ori-E. coli, der die funktionelle Replikation in *E. coli* gewährleistet, mehrere Resistenzgene, z.B. gegen Kanamycin und Spectinomycin,
 20 Insertionsstellen für das Einbringen des Fremdgens und gerichtete T-DNA Randsequenzen, die beim Gentransfer die Erkennung von Anfang und Ende des Fremdgens gewährleisten. Mit dem Ti-Plasmid wird *A. tumefaciens* transformiert.

Zur Infizierung der Nutzpflanze werden von dieser Blattscheiben gestanzt, die in
 25 eine flache Schale (Petrischale) gelegt werden. Anschließend fügt man eine Lösung von rekombinanten *Agrobakterien* hinzu und überführt nach einigen Minuten die Blattscheiben auf ein Medium mit Nährzellen (z.B. Filterpapier). Verwundete Zellen an den Rändern der Blattscheiben setzen Faktoren frei, die zur Infektion der Pflanzenzellen durch das *Agrobakterium* führen. Nach 2-3 Tagen werden die
 30 Blattscheiben auf ein sproßstimulierendes Medium, das ein Antibiotikum enthält, welches die *Agrobakterien* abtötet (z.B. Cefotaxim), überführt und 2-3 Wochen

kultiviert. Die Sprosse werden auf ein wurzelinduzierendes Medium transferiert und nach weiteren 2-3 Wochen in Erde eingepflanzt.

Beispiel 13: Diagnostische Sonden

- 5 Die Genfragmente Hc1 oder Hc2 oder homologe Genfragmente oder Teile davon (Länge mindestens 20 Basenpaare), die die für RNA-Helikasen charakteristischen Homologieboxen enthalten, können als diagnostische Sonden eingesetzt werden. Dazu werden die DNA-Fragmente auf einer geeigneten Matrix immobilisiert (z.B. Nylonmembran, Chip). Die mRNA eines Patienten wird aufgereinigt und über
10 reverse Transkription, z.B. mit MMLV Reverser Transkriptase, 2 h bei 37°C, in cDNA umgeschrieben. Gleichzeitig wird die cDNA markiert, z.B. mit 32P oder Digoxigenin. Die cDNA wird in einem geeigneten Hybridisierungspuffer, z.B. DIG EasyHyb (Boehringer Mannheim Ref. 1603558) verdünnt und mit der immobilisierten DNA bei stringenten Bedingungen hybridisiert.

15

Beispiel 14: Selektionsmarker

- Die Genfragmente Hc1 und Hc2 können als Selektionsmarker in der Molekularbiologie eingesetzt werden. Es wurde gezeigt, daß die Überexpression einer RNA-Helikase in Mauszellen, diese tolerant gegen die Substanz Leflunomid macht (Müllner-Patent). Um Hc1 oder Hc2 als Selektionsmarker zu verwenden, wird
20 ein Expressionsvektor konstruiert, die Hc1 oder Hc2 enthält und ein zu exprimierendes Gen. Dabei kann das zu exprimierende Gen neben dem Helikase-Gen liegen oder dazwischen. Mit dem Vektor werden geeignete Wirtszellen transformiert (z.B. Klonierung in einen pGEX-Vektor und Einschleusen in E. coli).
25 Liegt das zu exprimierende Gen neben dem Hc-Gen werden die Transformanten bei erfolgreicher Einschleusung des Vektors tolerant gegen Leflunomid. Den Erfolg der Ligation muß man z.B. über Blue-White-Screening überprüfen. Liegt das zu exprimierende Gen in dem Hc-Gen wird das Hc-Gen bei erfolgreicher Ligation zerstört und die Transformanten verlieren bei erfolgreicher Einschleusung des
30 Vektors ihre Toleranz gegen Leflunomid.

Figur 1

DEAD-Proteinsuperfamilie

5 ATPase A Motif ATPase B Motif

NH₂ ----- AXXXGKT----- PTRELA ----- GG ----- TPGR ----- **DEAD** ----- SAT ---- FXXXT ----

 21-299 2442 22-28 19-27 19-22 27-51 59-70 52-53

RGXD-----HRIGRXXR ----- COOH

10 20 24-236

eIF-4A

NH₂ ----- AXXXGKT ----- PTRELA ----- GG ----- TPGR-----**DEAD** ----- SAT ---- FINT ----

15 75 24 22 20 20 27 62 52

RGID ----- HRIGRXXR ----- COOH

 20 41

20 DEAH-Unterfamilie

NH₂ ----- GXX-XXGKT-----RVAA ----- XX-----TDGX ----- **DEAH** ----- SAT ---- FXT ----

 245-505 22-24 29- 7-8 19 28 58-61 75-84

XGXX ----- QRIGRXGR-----COOH

 25 315-373

DEXH-Unterfamilie

30 NH₂----- XXXXXGKT ----- PTRXXX ----- DEXH ----- TAT ---- FXXS -

 81-1904 19-27 55-60 24-30 44-72 46-55

XGXX ----- QRXGRXGR ----- COOH

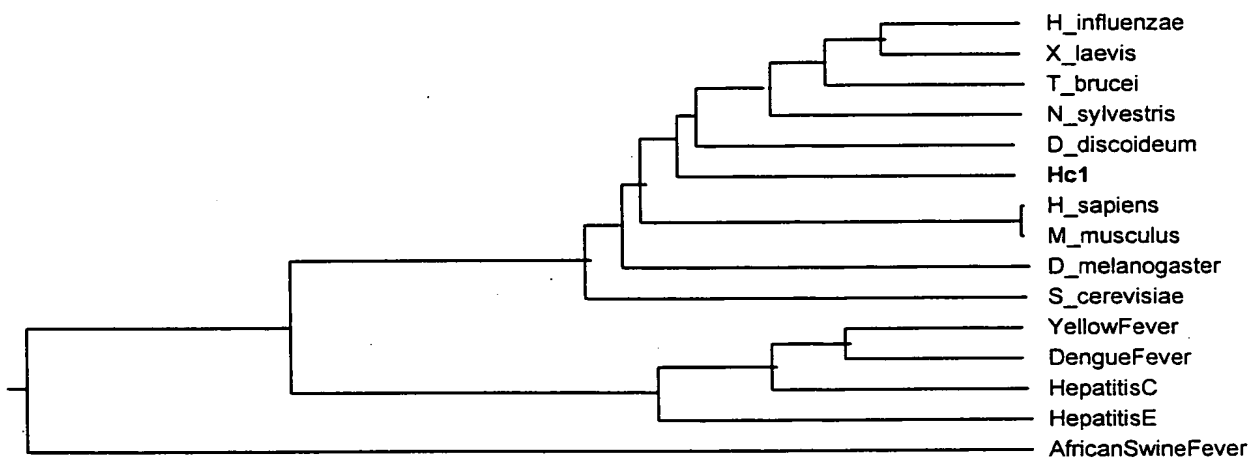
 38-44 155-1799

Figur 2:

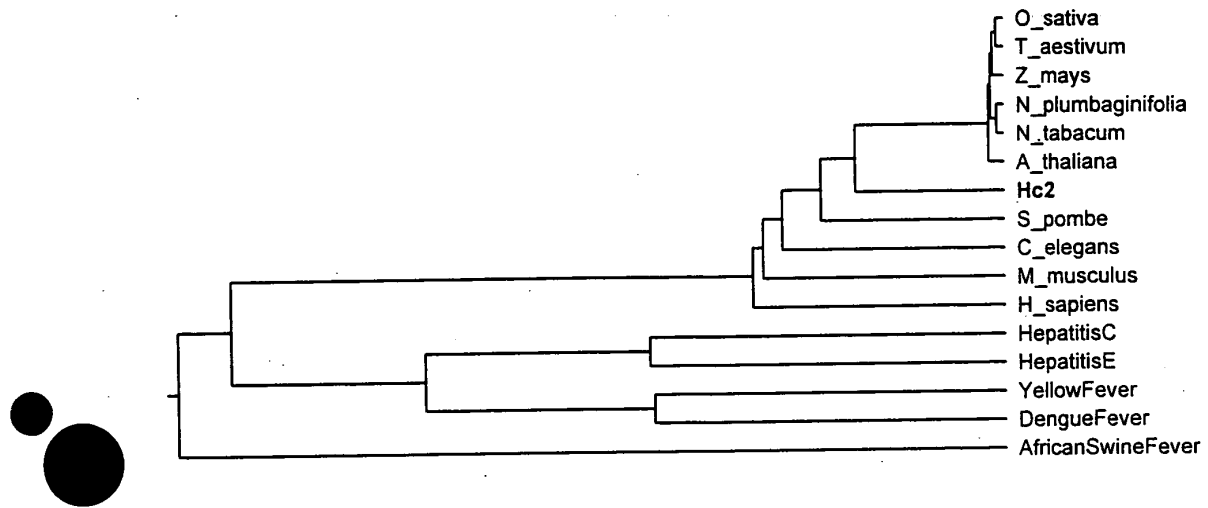
	DEAD	NH ₂ ...G-GKT---PTRELA---CG---TPGR---DEAD---SAT---RG-D---KRIGR-R---COOH
	DEAH	NH ₂ ...G-GKT---P-R---A-----T-G---DEAR---SAT-----R-GR-R---COOH
	DEXH	NH ₂ ...G-GK---P-R---A-----T-G---DE-W---SAT-----R-GR-R---COOH
5	DEAH*	NH ₂ ...G-GKT-----DEAH--A-----GR-----COOH
	Funktion:	ATP-Bindung
		ATPase
		RNA-Helicase
		ATPase
		RNA-Bindung

10

Figur 3A: Phylogenetischer Baum Hc1



Figur 3B : Phylogenetischer Baum Hc2



Figur 4: Hc1 - DNA-Sequenz

```

CCC ACT AGA GAA CTC GCT ATG CAA ATC GAA AGA GAG TCC GAA AGA
TTT GGT AAA TCC TCT AAG CTT AAA TGT GCT TGT ATC TAT GGT GGT
5 GCT GAC AAA TAC TCC TAA AGA GCA CTT CTC CAA TAA GGT GTA GAT
GTA GTT ATT GCT ACT CCT GGT AGA CTT ATT GAC TTT TTA GAA AGT
GAA ACT ACT ACT TTA CGT AGA GTT ACT TAT CTC GTA TTA GAT GAA
GCA GAT AGA ATG TTA GAT ATG GGT TTT GAA ATT TAA ATT AGA AAA
ATC TTG GGT TAA ATT AGA CCT GAT CGT TAA ACA TTG ATG TTT TCT
10 GCT ACC TGG CCT AAG AAT GTT TAG AAT CTT GCT TAA GAT TAT TGC
AAG AAT ACT CCC GTT TAT GTT CAA ATC GGA AAA CAT GAA TTA GCT
ATT AAC GAA AGA ATT AAA TAA ATT GTT TAT GTT ACA GAT CAA TCA
AAG AAA ATC AAT CAA CTT ATC AAG CAA TTA GAT TGT TTG ACT TAG
AAA GAT AAA GTA TTG ATT TTC GCT TAA ACA AAG AAG GGA TGT GAA
15 AGC ATG AGT CGT ATT TTG AAT AAA GAA GGA TTT AAG TGT CTT GCT
ATC CAT GGT GAC AAA GCC TAA AAA GAC AGA GAC TAT GTT ATG AAC
AAG TTC AAA AGC GGA GAA TGC AGA ATC CTT ATT GCT ACA GAC GTA
GCC AGT AGA GGT TTG GAT GTT AAG GAT GTC TCC CAC GTA TTT AAT
TAC GAT TTC CCA AAG GTT ATG GAA GAC TAT GTC CAC AGA ATC GGT
20 AGA ACG

```

Figur 5: Hc1 - Aminosäure-Sequenz

PTRELAMQIERESERFGKSSKLCACIYGGADKYSQRALLQQGVDDVVIAT**P**GRLIDFLESET
 TTLRRVTYLVLD**E**ADRMLDMGF**E**IQIRKILGQIRPD**R**QTL**M**FSATWPKNVQNLAQDYCKNTP
 VYVQIGKHELAIN**E**RIKQIVYVTDQSKKINQLIKQLDCLTQKDKVL**I**FA**Q**T**K**KGCESMSRIL
 NKEGFKCLAIHGDKAQKDRDYVMNKF**K**SGECRIL**I**ATDVAS**R**GLDVKD**V**SHVFNYDFPK**V**ME
 DY**V**H**R**IG**R**T

Figur 6: Hc2 - DNA-Sequenz

```

CCC ACC AGA GAA TTA GCC CAA TAA ACT ATC ACC GTT ATT ATG TAC
TTA GGT GAA TTC TTG AAG GTC TCC GCC TAT GCT TGC ACT GGT GGT
30 ACT GAT CCC AAG GAA GAT AGA AAG AGA TTA AGA GAA GGT GTC CAA
GTC GTT GTT GGT ACC CCT GGT AGA GTT TTG GAT TTA ATC TAA AAG
AAG ACT TTA GTC ACC GAT CAC TTA AAA TTA TTC ATT TTG GAC GAA
GCC GAT GAA ATG TTA GGA AGA GGT TTC AAG GAT CAA ATT AAC AAA
ATC TTC TAA AAC TTA CCC CAC GAT ATC TAG GTT GCT CTT TTC TCT

```


32

GCT ACC ATG GCT CCC GAA ATT CTT GAA ATT ACC AAG TAA TTT ATG
 AGA GAC CCC GCT ACT ATC CTT GTC AAG AAT GAT GAC TTG ACT TTG
 GAC GGT ATT AAA TAA TTC TAC ATC GCC TTA GAT AAG GAA GAA TGG
 AAG TTT GAC ACC TTA GTC GAA TTA TAC AAT AAC ATC GAA ATC GCT
 5 TAA GCT ATT ATC TAT TGC AAC ACC AAG AAG AGA GTC GAT GAA TTA
 AGA GAC AAG CTT ATT GAA AAG AAT ATG ACC GTC TCT GCT ATG CAC
 GGT GAA ATG GAC CAA TAA AAC AGA GAT CTT ATT ATG AAG GAA TTC
 AGA ACC GGT ACC TCC AGA GTT CTT ATC ACT ACT GAT TTG CTC TCC
 AGA GGT ATT GAT ATC CAT CAA GTC AAC TTG GTT ATC AAC TAC GAC
 10 TTA CCC CTT AAG AAG GAA TGT TAT ATT CAC AGA ATC GGT AGA ACA

Figur 7: Hc2 - Aminosäure-Sequenz

PTRELAQQTITVIMYLGEFLKVSAYACTGGTDPKEDRKRLREGVQVVVGTPGRVLDLIQKKT
 LVTDLHLKLFILDEADEMLGRGFKDQINKIFQNLPHDIQVALFSATMAPEILEITKQFMRDPA
 15 TILVKNDDLTLTGDIKQFYIALDKEEWKFDLVELYNNIEIAQAI IYCNTKKRVDEL RDKLIE
 KNMTVSAMHGEMDQQNRDLIMKEFRTGTSRVLITD LLSGGIDIHQVNLVINYDLPLKKECY
 IHRIGRT

1. Nukleinsäure kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit
5 mindestens 8 Nukleotiden, wobei Fig. 4 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 6 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei Fig. 6 Teil des Anspruchs ist.
10
3. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
- 15 4. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 erhältlich aus Ciliaten.
5. Nukleinsäuren nach Anspruch 4 erhältlich aus *Tetrahymena thermophila*.
6. DNA und RNA-Antisensestrang erhältlich aus Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 bis 5.
20
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
25
8. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
- 30 9. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 5 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.

10. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
11. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10,
5 dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.
12. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
- 15 14. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.
- 20 15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur
25 Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen und/oder Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß
30 Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoff formuliert wird.

16. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

5 17. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur Analyse
10 des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen und/oder zur Analyse von Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder
15 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.

18. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß
20 Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

19. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Identifizierung funktioneller
25 Interaktoren.

20. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1- 6 zum Auffinden von Varianten der RNA-Helikase, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene
30 Variante isoliert wird.

21. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Beeinflussung der Proteinbiosynthese.
- 5 22. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide gemäß Anspruch 21 zur Hemmung der Degradation der mRNA und/oder Stimulation der Degradation der mRNA und/oder Stabilisierung von mRNA.
23. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide nach Anspruch 21 zur
10 heterologen Expression in Nutzpflanzen.
24. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 als Selektionsmarker in der Molekularbiologie.

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Bereitstellung zweier neuer Nukleinsäuren - Hc1 und Hc2 - die homolog zu bekannten DEAD-Box-Proteinen, korrespondierend mit RNA-Helikasen sind uns aus Ciliaten gewonnen werden können.

Die Erfindung beschreibt weiterhin das Einbringen der neuen Nukleinsäuren über rekombinante DNA-Technologien in geeignete Zielzellen und deren Verwendung für die Regulation der Transkription und der Translation.

Die Erfindung beschreibt weiterhin die Transkription in vitro oder in vivo der neuen Nukleinsäuren zur Herstellung neuer Proteine, sowie deren Verwendung in Therapie, Diagnostik.